

Fls. N.º 32
Proc. N.º 085/74
Rub. Sadato

{ 1 a 45

J. B.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO COMPARATIVO DAS LINHAGENS
MINEIRA E PAULISTA DO SCHISTOSOMA MANSONI

1-) INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma parasitose de caráter endêmico, de alta prevalência, encontrada na África e nas Américas (Barbosa, 1959). Os maiores focos brasileiros estão situados no Nordeste e no estado de Minas Gerais. A doença parece ter-se disseminado, devido à migração interna, para outras unidades da Federação, principalmente para a região Centro-Sul, (Rey, 1956).

Estima-se que 10% da população brasileira esteja parasitada pelo Schistosoma mansoni. Existem várias localidades do Nordeste brasileiro onde se registram índices de prevalência acima de 80%, (Pellon & Teixeira, 1950 e 1952). A alta prevalência da esquistossomose, provoca grandes reflexos na produtividade do homem, pois é na faixa etária de maior atividade que aparecem os sintomas e sinais mais graves.

As zonas quentes e úmidas, desde a Paraíba até o Norte de Minas Gerais, são as mais atingidas, existindo, entretanto, focos isolados de grande importância, constatados em diversos estados, (Pessoa, 1974).

Pirajá da Silva (1908 a 1912) registrou os primeiros casos de esquistossomose humana no Brasil, relacionando as lesões anatomopatológicas encontradas, com o trematódeo estabelecido no sistema porta. Estudou, também a anatomia e biologia do verme, trazendo grande contribuição à comprovação da teoria dualista. Lutz (1916 a 1918) identificou as regiões endêmicas do Nordeste e estudou as principais espécies de planorbídeos do País.

A expansão da esquistossomose foi evidenciada a partir de 1950, pelo fato de se terem intensificado as pesquisas ou pela real disseminação da verminose, (Cunha, 1970). Esta verificação foi feita, em 1950 pelo inquérito helmintológico realizado pela Divisão Sanitária do Departamento de Saúde, por Pellon & Teixeira, em onze estados do Nordeste e Leste e em 1952, pelos mesmos autores, no Centro-Oeste e no Centro-Sul, excetuando-se São Paulo.

Para que se obtenham informações úteis ao combate a esta importante endemia, torna-se necessário o conhecimento profundo de vários aspectos do ciclo biológico do parasito. Sabemos da importância da compreensão das relações parasito-hospedeiro, para que se consiga informações precisas sobre a patogenia e epidemiologia das doenças parasitárias.

Este relacionamento parasito-hospedeiro, pode ser estudado sob vários ângulos, incluindo-se os aspectos bioquímicos e imunológicos que envolvem o problema. Em virtude dos aspectos acima referidos, o estudo da relação parasito-hospedeiro da suscetibilidade do molusco à infecção pelo trematódeo vem merecendo grande atenção por parte dos pesquisadores.

Pesquisas sobre o comportamento do Schistosoma mansoni, frente ao hospedeiro intermediário, mostraram variações de suscetibilidade à infecção pelas diferentes espécies de caramujos. Paraense & Correa (1963a) admitiram a existência de duas raças de Schistosoma mansoni: uma tendo como hospedeira intermediária a Biomphalaria glabrata (Belo Horizonte) e a outra como hospedeira intermediária a Biomphalaria tenagophila (Vale do Rio Paraíba do Sul, São Paulo). Embora, estes mesmos autores (1963b) tenham conseguido infectar a

Biomphalaria tenagophila com miracídios procedentes da linhagem mineira, mil miracídios por molusco, tudo leva a crer que existe uma resistência natural à infecção cruzada entre as duas linhagens.

Era de se esperar que a alta resistência à infecção cruzada entre as diversas populações de moluscos determinada pelos diferentes graus de suscetibilidade, originando um isolamento genético entre estas populações, desenvolveria linhagens de esquistossomos com características próprias.

Estas linhagens foram estudadas sob vários aspectos por alguns autores. Desta forma, Files & Cram (1949) e Files (1951), trabalhando com Biomphalaria glabrata das Américas e do Egito, promoveram infecções cruzadas com cepas de S. mansoni da África e das Américas, concluindo que existem diferenças fisiológicas intra e interespecíficas entre as diversas populações de S. mansoni. Barbosa & Barreto (1960) verificaram que uma população de B. glabrata de Salvador era muito pouco suscetível à infecção com S. mansoni da cidade de Paulista, em Pernambuco e que a população pernambucana de B. glabrata era muito suscetível ao parasito autóctone. Estes autores não encontraram diferenças morfológicas quando compararam estes moluscos com outros da mesma espécie procedentes de várias localidades do Brasil. Segundo Barbosa & Barreto (1960) as diferenças de suscetibilidade não estariam relacionadas a procedência do parasito, já que B. glabrata de Paulista pode ser infectada com S. mansoni de M. Gerais e de outras localidades da Bahia, enquanto B. glabrata de Salvador foi resistente à infecção com S. mansoni de Recife e de localidades baianas.

Estudos utilizando cruzamentos de planorbídeos

mostram que existem características genéticas entre as populações de B. glabrata que poderiam ser responsáveis pelas diferenças de suscetibilidade à infecção com S. mansoni. Newton (1952 e 1953) demonstrou que a suscetibilidade de B. glabrata à infecção, pelo parasito está regulada geneticamente e parece depender de vários fatores. Este autor verificou que a idade do caramujo tem influência sobre a suscetibilidade.

Paraense & Correa (1963c) verificaram a variação de suscetibilidade ao S. mansoni de B. Horizonte, apresentada por B. glabrata de várias localidades do Brasil, cuja taxa de infecção variou de 0 a 100% entre as diversas populações de moluscos estudados. Constataram que os graus de suscetibilidade encontrados são expressão do ajuste fisiológico entre as linhagens do verme e do molusco e que dentro de uma mesma área endêmica estão relacionados ao genótipo das populações de caramujos. Paraense & Correa (1963b) verificaram que B. tenagophila de Pindamonhangaba era altamente resistente a uma cepa de S. mansoni de B. Horizonte e que B. tenagophila de S. José dos Campos, também resistente à população de S. mansoni de B. Horizonte, infectava-se facilmente com a população local. Moluscos B. glabrata de B. Horizonte, altamente suscetíveis à população autóctone do parasito, não se infectaram com o trematódeo de S. José dos Campos, demonstrando que as diferenças de suscetibilidade estavam relacionadas ao genótipo dos caramujos. Estes autores sugeriram haver uma adaptação entre os moluscos e as linhagens de S. mansoni.

Kagan & Geizer (1965), infectando três populações de B. glabrata, duas provenientes do Brasil e uma de Porto Rico, com S. mansoni, procedentes destes países, verifica-

ram a existência de diferentes graus de suscetibilidade apresentados pelos caramujos. Os moluscos oriundos das populações brasileiras mostraram-se menos suscetíveis às diversas linhagens de S. mansoni, do que os moluscos da cepa de Porto Rico. As B. glabrata do Brasil que se apresentavam altamente resistentes à infecção com S. mansoni de Porto Rico, eram facilmente infectadas com a linhagem autótone do parasito, sugerindo, também que a suscetibilidade dos caramujos, depende de uma adaptação entre o hospedeiro e o parasito e que a constituição genética do miracídio é uma variável decisiva na realação parasito-hospedeiro.

Richards & Merrit (1972) e Richards (1973) estudando o grau de suscetibilidade de caramujos jovens descendentes de B. glabrata que apresentavam um índice de suscetibilidade de 100%, comparando-os com B. glabrata totalmente resistentes e com caramujos descendentes de cruzamentos destas populações concluíram que os graus de suscetibilidade dos caramujos deviam estar regulados por quatro ou mais fatores genéticos. Os genes que determinam a suscetibilidade poderiam ser selecionados a partir de populações de caramujos resistentes. Os mesmos autores verificaram que os caramujos jovens suscetíveis podem tornarse resistentes ao atingirem a maturidade. Richards (1973) infectou com S. mansoni progênies de B. glabrata resultantes dos cruzamentos de jovens suscetíveis com adultos suscetíveis; jovens resistentes com adultos resistentes e jovens suscetíveis com adultos resistentes. Desta forma o autor demonstrou que a resistência apresentada pelo caramujo adulto, suscetível quando jovem, é determinada por um único gene dominante com caráter de herança mendeliana.

Os resultados obtidos por alguns autores parecem demonstrar que há alguma relação entre o ajustamento fisiológico entre caramujo e helminto e a patogenicidade apresentada pelo S. mansoni no hospedeiro definitivo.

Warren (1967) estudou a patogenicidade, em camundongos, determinada por quatro cepas de S. mansoni (Porto Rico, Brasil, Egito e Tanzânia), encontrando diferenças significativas, entre estas cepas, quanto ao poder de penetração das cercárias, desenvolvimento do verme e lesões provocadas no baço e fígado. Magalhães & Carvalho (1969) estudaram o poder de penetração de cercárias das linhagens mineira e paulista, em camundongos, evidenciando maior poder de penetração da linhagem mineira. Magalhães, Alcântara & Carvalho (1975), verificaram diferenças de patogenicidade produzida pelas linhagens mineira e paulista de S. mansoni, em camundongos. Lemos Neto (1975) verificou que o número de granulomas por verme, nas duas linhagens, variou inversamente com o número de vermes, por camundongo, sendo que na linhagem paulista observou maior desenvolvimento das cercárias que penetraram pelo tegumento dos roedores. Magalhães (1976) sugere uma possível correlação clínica com os aspectos acima referidos, quanto a patogenicidade provocada pelas duas linhagens.

Além das linhagens de S. mansoni formadas a partir da diversidade das características morfogênicas dos hospedeiros intermediários e do ajuste fisiológico entre hospedeiro intermediário e o verme, foi também verificado que a participação de vários hospedeiros definitivos poderiam originar diferenças de comportamento do verme. Bastos (1975) estudando as linhagens humana e silvestre de S. mansoni do Vale do Rio Pa-

raíba, verificou que existiam diferenças significativas quanto ao comportamento do parasito nos hospedeiros intermediários e definitivos. Indicou também que estas linhagens aparentavam possuir determinantes antigênicos próprios.

O conjunto de dados disponíveis mostra que devem existir diferentes linhagens de S. mansoni, resultantes das pressões seletivas exercidas durante a interação parasito-hospedeiro, tanto no molusco quanto no hospedeiro definitivo. Contudo, não sabemos se essas diferentes linhagens possuem diferentes determinantes antigênicos.

Vários autores estudaram os antígenos de S. mansoni por técnicas de precipitação em meio gelificado. Damian (1966 e 1967) verificou que o S. mansoni possui determinantes antigênicos, em comum, com o hospedeiro definitivo, além de pesquisar, por imunodifusão, o número de sistemas precipitantes. Simthers (1960), Kagan & Pellegrino (1961), Kagan (1961, 1963 e 1969) e Kent (1963b) procuraram também identificar estes sistemas precipitantes, utilizando a mesma técnica, obtiveram número variável de sistemas precipitantes.

Empregando a técnica de imunoeletroforese, Biguet et al (1962) e Capron et al (1965, 1968) analisaram a composição antigênica das várias fase do ciclo do S. mansoni, comparando-as com antígenos de outros trematódeos, cestódeos e nematódeos. Verificaram que existem antígenos, em comum, entre os vários estágios do ciclo e entre as diversas espécies de helmintos. Não conseguiram detectar diferenças qualitativas entre os vermes da mesma espécie, quando comparados por sexo, embora admitam que possa haver diferenças quantitativas.

A análise efetuada por Lemos Neto (1975) com cer

cárias das duas linhagens, paulista e mineira de S. mansoni utilizando técnica de imunofluorescência indireta, não evidenciou diferenças dignas de nota.

O estudo imunológico da esquistossomose vem atraindo grande número de pesquisadores, em razão de que a abordagem por este ângulo, tem fornecido meios para uma melhor análise das relações hospedeiro-parasito e da patologia provocada pelo parasito nos hospedeiros intermediários e definitivos.

Entretanto, os antígenos de S. mansoni tem mostrado peculiaridades intrínsecas e extrínsecas, para as quais a metodologia empregada atualmente no seu estudo, ainda não conseguiu desvendá-las totalmente. A heterogeneidade e complexidade da composição antigênica do helminto, nas suas diversas fases do ciclo e a dificuldade de obtenção deste material são os maiores obstáculos para uma análise mais acurada.

Sabemos por experiência de outros autores que a obtenção de antígenos de vermes adultos, das duas linhagens é laboriosa e que o estudo da linhagem paulista de S. mansoni, apresenta maiores dificuldades, por estar esta linhagem menos adaptada ao hospedeiro intermediário do que a linhagem mineira, dificultando assim, a obtenção das formas larvárias e adulta, do verme.

A utilização de técnicas de precipitação em meio gelificado, como imunodifusão e imuneletroforese, que são de manipulação relativamente fácil constituiu uma alternativa para nosso caso. Estas técnicas já foram utilizadas, no estudo destes antígenos por outros autores que obtiveram resultados animadores mas que apresentaram certas discrepâncias.

Os antígenos de S. mansoni são muito complexos

e de difícil manipulação não tendo permitido a padronização de esquemas de imunização.

O objetivo de nosso trabalho foi o estudo dos antígenos do S. mansoni visando a comparação das linhagens paulista e mineira do verme. Com esta finalidade utilizamos as técnicas acima apontadas a fim de avaliarmos sua viabilidade e eficiência no estudo destes antígenos.

2-) MATERIAL E MÉTODOS

1-) Manutenção das linhagens.

Foi mantido o ciclo biológico do S. mansoni, em laboratório, utilizando-se como hospedeiros intermediários a B. glabrata para a linhagem mineira e a B. tenagophila para a linhagem paulista e como hospedeiros definitivos Mus musculus albino.

Foram obtidos miracídios a partir de granulomas procedentes de fígados de camundongos previamente infectados com S. mansoni das linhagens BH ou SJ. Os fígados foram triturados em liquidificador, sendo o triturado suspenso em água. A suspensão foi passada em peneiras metálicas de malhas 0,149, 0,074 e 0,037mm, com a finalidade de isolarmos os granulomas. Estes granulomas foram suspensos em água e expostos à luz e ao calor fornecidos por lâmpadas elétricas, colocadas a uma distância que permitia manter a suspensão à temperatura de 28°C, durante duas horas, (Standen, 1951, 1952).

Planorbídeos B. glabrata procedentes de B. Horizonte (BH) e B. tenagophila oriundos do Vale do Rio Paraíba do Sul (SJ), foram introduzidos em frascos, contendo 10 miracídios recém eclodidos para cada caramujo. Os frascos eram expostos ao calor e a luz, (Standen, 1952). Terminada a exposição os caramujos eram recolhidos em cristalizadores, contendo água decolorada, num volume de 200ml para cada molusco.

A fim de se obter cercárias, quarenta dias após a infecção miracidiana, os caramujos foram colocados individualmente em placas de Petri e expostos ao calor e luz de lâm-

padas elétricas que mantinham a temperatura da água a 28°C por duas horas, (Pellegrino & Macedo, 1955 e Upatham, 1973). As cercárias eram contadas em número de 100 ou 200, com o auxílio de lupa estereoscópica.

A infecção dos camundongos albinos foi efetuada por imersão parcial dos roedores em suspensão cercariana, contendo 200 cercárias por camundongo, (Standen, 1949; Brener, 1956; Smithers, 1965 e Warren, 1967). Realizamos também infecções pela cauda, sendo então utilizadas 100 cercárias por animal, (Olivier & Stirewalt, 1952; Stirewalt, 1953 e Magalhães, 1969).

Os camundongos utilizados eram oriundos do biotério do Departamento de Parasitologia da UNICAMP.

Os vermes adultos foram obtidos por perfusão do sistema porta, fígado e veias mesentéricas dos camundongos previamente infectados, após 60 dias da data da exposição às cercárias, (Yolles et al, 1947; Brener, 1959 e Smithers, 1965).

Os esquistossomos coletados durante as perfusões eram coletados em pequenas placas de Petri, lavados três vezes e mantidos em salina fisiológica, permanecendo na estufa a 37°C por uma hora, para eliminação do conteúdo intestinal. Posteriormente, eram separados por sexo, contados, lavados em água destilada e guardados em congelador a -10°C.

2-) Obtenção de antígenos.

Os vermes eram liofilizados para o preparo de antígenos brutos e extratos salinos, visando, respectivamente a posterior imunização de coelhos e a realização das reações de imunodifusão e imunoeletroforese.

Os antígenos brutos para a imunização dos coe-

lhos foram preparados, com salina fisiológica, em banho de gelo, triturando-os em homogeinizador manual de tecido (C,1-018nm). O material triturado era emulsionado em adjuvante incompleto de Freund, (Freund, 1951) na proporção de 1:2 de modo que em 0,4ml desta emulsão contivesse 6,66mg de verme seco, para inoculações nos coxins plantares dos coelhos, (Damian, 1966).

Os antígenos brutos para inoculações intravenosas eram obtidos, pela mesma técnica, não se utilizando, entre tanto o adjuvante de Freund. Os antígenos, continham de 3 a 5mg de verme seco por mililitro.

Os extratos salinos, foram preparados, triturando-se vermes secos, em homogeinizador manual, em banho de gelo, com salina tamponada (NaCl 0,15M em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,2). A suspensão era mantida por 12 horas em refrigerador a 4°C, sob agitação constante, para maior extração dos componentes proteicos. Em seguida, foram centrifugadas as suspensões a 18.000g, durante 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes retirados constituíam os extratos salinos, que eram mantidos em refrigerador a -10°C e divididos em pequenas alíquotas, (Damian, 1966). Estes extratos salinos foram utilizados nas reações de imunodifusão e "ring test". Os extratos salinos para as reações de imunoeletroforese, diferiam apenas quanto ao solvente, que era constituído de salina 0,018M, (Biguet et al, 1962 e 1965)

Os extratos salinos foram denominados:

BHM	(extrato salino de <u>S. mansoni</u> macho da linhagem BH)
BHF	(" " " " " fêmea " " BH)
SJM	(" " " " " macho " " SJ)
SJF	(" " " " " fêmea " " SJ)

3-) Dosagem de proteínas e polissacáridos nos extratos salinos

As dosagens de polissacáridos foram efetuadas pela técnica de Dubois et al (1956), tendo como contrôlo, solução de glicose, contendo 100ug/ml. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro Zeiss PMQ III, no comprimento de onda 490 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com 1cm de trajeto ótico.

As proteínas foram dosadas pelo método de Folin Ciocalteu, modificado por Lowry et al (1951). As leituras foram efetuadas no mesmo espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 660nm. A curva padrão foi obtida com soro de caititu (Tayassu sp), previamente dosado pelo micro-Kjeldhal, (Kabat & Mayer, 1968).

4-) Obtenção de imunesoros

Para a obtenção de imunesoros anti-S. mansoni foram inoculados coelhos pesando entre 2 a 2,5Kg, seguindo esquema preconizado por Damian (1966) e posteriormente modificado. Foram inoculados dois coelhos para cada antígeno, assim denominados:

BHM1 e BHM2	(inoculados com <u>S. mansoni</u> macho da linhagem BH)
BHF1 e BHF2	(" " " " fêmea " " BH)
SJM1 e SJM2	(" " " " macho " " SJ)
SJF1 e SJF2	(" " " " fêmea " " SJ)

Foram inoculados 0,4ml de antígeno bruto com adjuvante de Freund incompleto, sendo 0,1ml em cada coxim plantar. Sessenta dias após repetimos a aplicação. Um mes após foram iniciadas injeções intravenosas de 1ml de extrato bruto - sem adjuvante, contendo de 3 a 5mg de verme seco, na veia mar-

ginal da orelha, com intervalos de 30 dias. Dez dias após cada injeção intravenosa, os coelhos eram sangrados e os soros testados para verificação dos níveis de anticorpos. Estas amostras de soros eram mantidas em congelador, com meritolate a 1:10000. Quando da sexta inoculação intravenosa, somente os coelhos do grupo 1, foram submetidos a este esquema. Os animais do grupo 2 receberam aplicações de extrato bruto, sem adjuvante, contendo 1,5mg de verme seco por mililitro. As aplicações foram feitas no dorso, em dias alternados até completar 8 injeções. Após o uso deste esquema os coelhos foram sangrados para colheita de amostras de soros. Decorrido um mes foi realizada nova série de 6 injeções intradérmicas, de 1ml de extrato bruto sem adjuvante, contendo 1,5mg de verme seco. Os coelhos foram novamente sangrados 10 dias após a última injeção.

Antes do início da imunização foram colhidas amostras de sangue para verificarmos se não haviam anticorpos naturais anti-S. mansoni.

Soros de camundongos normais e camundongos infectados com S. mansoni das duas linhagens, foram obtidos, sangrando-se os animais pelo plexo braquial vascular, após anestesiá-los com éter etílico.

5-) Reações em meio gelificado.

As lâminas para imunodifusão foram preparadas - dissolvendo agar a 2% em salina tamponada (NaCl 0,3M, em tampão fosfato de sódio 0,04M, pH 7,2). Seis mililitros de agar eram vertidos em lâminas de vidro de 9x5cm, de modo a se obter uma camada de 1,5mm de espessura. Os antisoros eram colocados no poço central e os antígenos nos poços periféricos e preen-

chidos várias vezes, (Damian, 1966).

O agar utilizado para imunoeletroforese diferiu apenas quanto ao solvente (tampão veronal-HCl, 0,05M, pH 8,6). O agar foi distribuído em lâminas de 7,5x5cm e 11x5cm, de modo a formar camadas de 3mm de espessura. Para realização das imunoeletroforeses, (Grabar & Burtini, 1964 e Biguet et al 1965) foram utilizadas condições diversas, como: 5 horas de corrida, com 2 volts/cm; 3 horas com 4v/cm e 2 horas com 5v/cm. A concentração do antígeno, bem como o diâmetro dos poços eram variados.

Foram analisados os extratos salinos frente aos imunossoros homólogos e heterólogos, por imunodifusão e por imunoeletroforese, em condições diversas, procurando-se encontrar as melhores condições de reação entre antígenos e antissoros.

As lâminas de imunodifusão e imunoeletroforese, foram examinadas diariamente, permanecendo os três primeiros dias em temperatura ambiente e outros três dias em geladeira a 4°C, quando eram realizadas as leituras definitivas. Após estas operações as lâminas eram lavadas em salina 0,15M, várias vezes ao dia. O tempo estabelecido para a lavagem foi de um dia para cada milímetro de espessura do agar, (Uriel, 1966).

Os antissoros obtidos em coelhos anti-S. mansoni foram testados frente aos soros de camundongos normais e aos soros de camundongos infectados, pelas duas linhagens. Estes antissoros foram testados, também frente a hemoglobina e a estroma solubilizado de hemácias de camundongos normais. Estas reações foram efetuadas, por imunodifusão, com o intuito de evidenciarmos antígenos do hospedeiro no S. mansoni, (Clegg & Smithers, 1970, Smithers, Terry & Hekley, 1969).

6-) Obtenção de hemoglobina e estroma de hemácias de camundongos normais.

Sangue de camundongos normais foram coletados - em recipiente, contendo solução de citrato de sódio a 3,8%. O conjunto foi lavado várias vezes com salina 0,15M e centrifugado. A suspensão de hemácias foi hemolizada em solução hipotônica de tampão fosfato de sódio 0,005M, pH 6,0, (Lenard, 1970)

A solubilização dos estromas de hemácias foi efetuada com n-butanol, na proporção de 4:3., por agitação vigorosa e mantida a baixa temperatura, (Maddy, 1964 e Anstee & Tanner, 1974).

7-) Reações de hemaglutinação direta com hemácias de camundongos normais e soros normais e imunes de coelhos.

As reações foram efetuadas com suspensão de hemácias de camundongos normais e soros normais e imunes de coelhos anti-S. mansoni. Para cada 0,5ml de soro em várias diluições foram acrescentados 0,1ml de suspensão de hemácias a 2%. O conjunto foi mantido à temperatura ambiente por uma hora após o que eram feitas as leituras depois de leve agitação em círculo, dos tubos de ensaio. As leituras foram efetuadas a olho desarmado e em microscópio ótico, (Damian, 1967).

3-) RESULTADOS1-) Manutenção das linhagens.

Os dados obtidos através da manutenção, em laboratório, das linhagens BH e SJ de S. mansoni indicaram que a B. glabrata é mais suscetível à infecção simpátrica do que a B. tenagophila (Tabela I).

Tabela I

Infecção de caramujos pelas linhagens BH e SJ de S. mansoni.

Especie de caramujo	Linhagem de <u>S. mansoni</u>	Numero de caramujos	Nº de caramujos infectados	Percent. de infec.
<u>B. glabrata</u>	BH	315	148	46,90%
<u>B. tenagophila</u>	SJ	243	12	4,90%

Não foram observadas diferenças significativas entre os índices de infecção esquistossomótica nos camundongos expostos à linhagens BH e SJ. Foi observado maior número de vermes machos em ambas as linhagens (Tabela II).

Tabela II

Infecção de camundongos por cercárias BH e SJ de S. mansoni.

Linhagem de <u>S. mansoni</u>	Nº de camundongos expostos	Nº de camundongos infectados	Percent. de infecção	Nº de vermes machos	Nº de vermes fêmeas	Nº de vermes total.
BH	534	512	95,88%	17.224	11.138	28362
SJ	438	407	92,90%	11.985	6.097	18082

2-) Obtenção de antígenos.

Os vermes obtidos foram contados e armazenados, como descrito em material e métodos. Após liofilização porções de 2mg de vermes eram homogeneizadas em 1ml de salina tamponada para extração dos antígenos solúveis (extratos salinos).

O peso médio dos vermes machos foi bem maior do que o peso médio dos vermes fêmeas em qualquer das duas linhagens. Cada miligrama de peso seco representa, em média 30 vermes fêmeas ou 10 vermes machos.

Os extratos salinos obtidos das linhagens BH e SJ, machos e fêmeas, foram comparados em seu teor de proteínas e polissacárides. Os resultados obtidos e apresentados na tabela III, mostram diferenças na relação proteína/polissacáride, entre os vermes machos e fêmeas. Não foram encontradas diferenças quando vermes machos ou fêmeas de ambas as linhagens eram comparados.

Tabela III

Teor médio de proteínas e polissacárides nos extratos salinos preparados preparados a partir de verme seco/ml.

Extratos salinos	Proteína ug/ml	Polissacarídes ug/ml	Relação proteína polissacaríde
BHM	870	198	4,3
BHF	1092	166	6,5
SJM	890	190	4,6
SJF	1062	158	6,7

Estes extratos salinos foram testados em sua antigenicidade através das reações de precipitação e quanto a sua estabilidade, o aquecimento, congelamento e descongelamento sucessivos e a ação do mertiolate.

Resultados positivos foram obtidos com os soros de coelhos anti-S. mansoni quando testados pela técnica de imunodifusão ou "ring test". No entanto, não foi possível obter os mesmos resultados quando os extratos salinos eram aquecidos a 56°C por uma hora ou congelado e descongelado sucessivamente ou adicionados de mertiolate, na concentração final de 1:10000

A partir destes resultados os extratos salinos após dosagem de proteínas e polissacarídes foram distribuídos, em alíquotas de 0,5ml e mantidos a -10°C até o momento do uso

3-) Obtenção de imunesoros.

Os imunesoros obtidos 10 dias após a 1ª inoculação intravenosa do extrato bruto de vermes (90 dias após a 1ª inoculação), foram testados pela técnica de Ouchterlony. Concentrações variáveis de antígenos foram empregadas (0,250 a 5,0mg prot./ml). Em todas as experiências foi encontrado apenas um sistema precipitante tênue que apresentava reação de identidade quando testado cruzadamente com os antígenos obtidos de vermes machos ou fêmeas de uma linhagem ou da outra.

Resultados similares continuaram sendo obtidos até 5ª inoculação intravenosa do extrato bruto.

A partir destes resultados quatro coelhos (grupo 1) receberam nova dose intravenosa do extrato bruto e quatro coelhos (grupo 2) receberam injeções intradérmicas em dias alternados, do extrato bruto, como descrito em material e métodos.

Os soros obtidos dos animais do grupo 1 não mais apresentaram reações de precipitação quando testados pela técnica de Ouchterlony e "ring test" utilizando-se concentrações variáveis do antígeno.

Os imunesoros dos coelhos do grupo 2 passaram a apresentar número variável de sistemas precipitantes. No entanto, a evidenciação destes sistemas só era possível quando utilizava-se luz oblíqua.

A fig. 1 mostra os resultados obtidos com o imunesoro anti-S. mansoni (BHF) e os diferentes extratos salinos. Este imunesoro revelou a presença de pelo menos dois antígenos comuns a BHM, SJM e SJF. Aparentemente apenas um sistema precipitante é específico de BHF. Concentrações mais baixas de proteínas apresentaram resultados inferiores, indicando que provavelmente a concentração relativa dos antígenos nestes extratos salinos, é baixa, apesar da concentração elevada de proteínas totais.

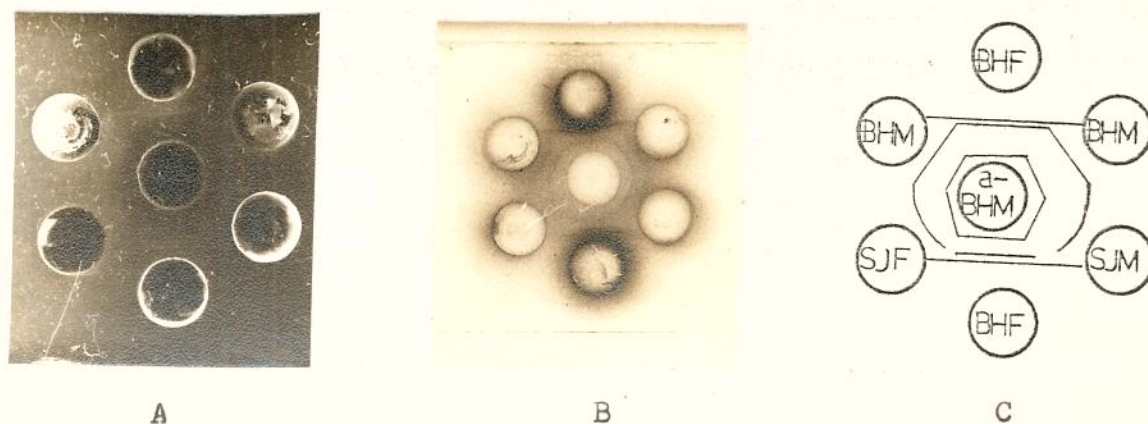


Fig. 1 Reações de precipitação em gel de agar do soro anti-BHF com extratos salinos homólogos e heterólogos de S. mansoni.

A=fotografia antes da coloração; B=fotografia após a coloração; C=esquema das linhas de precipitação observada por luz oblíqua; BHF=antígeno de S. mansoni BHF; BHM=antígeno de S. mansoni BHM; SJM=antígeno de S. mansoni SJM; SJF=antígeno de S. mansoni SJF; a-BHF=soro de coelho anti-BHF.

Resultados foram obtidos com os demais imunesoros dos coelhos do grupo 2. O número de sistemas precipitantes nos diferentes imunesoros foi variável. Devido a fraca intensidade das linhas de precipitação, tornou-se impossível uma análise dos sistemas precipitantes.

Nos imunesoros obtidos em coelhos foram pesquisados anticorpos contra constituintes do hospedeiro. Como antígenos foram utilizados soros normais e imunes de camundongos e estroma de hemácias de camundongo, visto que não foram encontradas reações positivas com hemoglobina. Como controle de reação foram realizadas reações de precipitação, utilizando-se os mesmos antígenos frente a soros normais de coelhos.

Os imunesoros obtidos pela inoculação de extrato bruto de vermes machos BH ou SJ apresentaram um sistema de precipitação tênue quando testados frente a estroma de hemácia e ao soro normal de camundongo. Aparentemente estes sistemas apresentaram reação de identidade. (fig. 2).

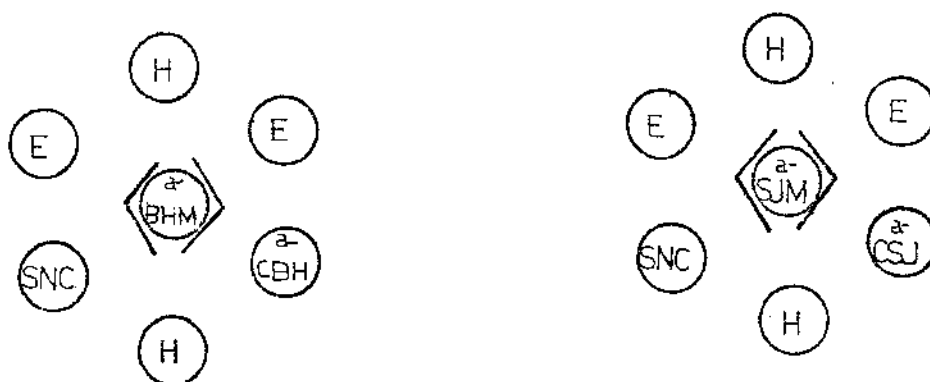


Fig. 2- Representação esquemática dos resultados de imunodifusão dos soros anti-BHM e anti-SJM, frente aos soros de camundongo normal e imune, hemoglobina e estroma de hemácias de camundongo

H=hemoglobina; E=estroma de hemácias de camundongos normais
 a-CBH=soro camundongo infectado com cercaria BH; a-CSJ=soro de camundongo infectado com cercaria SJ; SNC=soro normal de camundongo; a-BHM=soros de coelho anti-S. mansoni (BHM)
 a-SJM=soro de coelho anti-S. mansoni (SJM)

4-) DISCUSSÃO

Como vários autores já haviam observado (Magalhães, 1969a, 1969b; Magalhães & Carvalho, 1969, 1973; Bastos, 1975 e Lemos Neto, 1975) a linhagem BH do S. mansoni não apresenta dificuldade para sua manutenção, fornecendo grande quantidade de larvas e formas adultas do trematódeo, demonstrando um grande ajustamento fisiológico entre o verme e os hospedeiros. O mesmo não ocorre com a linhagem de S. mansoni, do Vale do Rio Paraíba que apresenta resistência às passagens sucessivas realizadas no laboratório.

Por este motivo foi-nos difícil obter grande quantidade de vermes e de formas larvárias da linhagem paulista.

Diferentes autores tem verificado variações de suscetibilidade dos planorbídeos à infecção pelo S. mansoni. Files & Cram (1949) e Files (1951) concluíram, em estudos de infecção cruzada entre diversas populações de S. mansoni, procedentes de várias regiões, que existem diferenças de ajustamento nas relações entre os moluscos e as populações de S. mansoni. Estas diferenças foram observadas a nível intra e interespecíficos Barbosa & Barreto (1960), infectando caramujos da mesma espécie mas de várias procedências, com diversas populações do parasito, admitiram que as características genéticas dos caramujos são responsáveis, pelos diferentes graus de suscetibilidade observados e que estes independem do parasito.

Newton (1952, 1953), demonstrou que a suscetibilidade da B. glabrata à infecção pelo S. mansoni está regulada geneticamente, dependendo de vários fatores, entre os quais a

idade dos moluscos. Paraense & Correa (1963b, 1963c) concluíram que os graus de suscetibilidade são expressão do ajuste fisiológico entre o parasito e o molusco, estando relacionados ao genótipo do caramujo mas que o parasito também contribui para o sucesso da infecção. Kagan & Geiger (1965) concordam que os graus de suscetibilidade, dependem da adaptação fisiológica entre o parasito e o hospedeiro, constituindo a estrutura genética do miracídio uma variável importante neste relacionamento.

Em decorrência de todos os fatos acima referidos e dos obstáculos surgidos na execução do presente trabalho, oriundos das dificuldades na obtenção de larvas e formas adultas e tendo em vista os trabalhos de Richards & Merrit (1972) e Richards (1973) nos quais esses autores concluem que populações de moluscos suscetíveis podem ser obtidas, por seleção genética a partir de populações de moluscos que apresentam baixa suscetibilidade à infecção miracidiana, sugerimos que para o desenvolvimento de futuros trabalhos sobre o S. mansoni, deveremos conseguir populações suscetíveis por seleção genética o que facilitará a obtenção de material antigênico.

A escolha do camundongo de laboratório, como hospedeiro definitivo, decorreu de algumas vantagens apresentadas, como facilidade de manipulação, apresentação de bom índice de infecção e patologia semelhante à apresentada pelo homem (Stirewalt, Kuntz & Evans, 1951; Moore, Yolles & Meleney, 1949; Brenner, 1956; Magalhães, 1966, 1969a e Warren, 1967). Entretanto, para obtenção de grande quantidade de esquistossomos, não nos pareceu ser o camundongo o hospedeiro ideal, por ser de pequeno porte, não suportando grande carga de vermes e apresentar elevado índice de mortalidade.

Outros animais apresentam a vantagem de quando inoculados com S. mansoni fornecerem maior número de vermes recuperados. Por exemplo, da cobaia são recuperados em média, 20% das cercárias inoculadas sob a forma de vermes adultos; o hamster permite que 30% das cercárias atinjam a maturidade; o macaco permite recuperação de um índice muito elevado de vermes (Brener, 1959). Contudo estes animais apresentam outras dificuldades, como o manuseio mais difícil ou alguns, como a cobaia, não eliminam ovos viáveis nas fezes.

Animais silvestres como rato-do-campo (Zigodontomys brachiurus), rato-de-arroz (Oryzomys nigripes eliurus), rato-d'água (Nectomys squamipes squamipes) e preá (Cavia aperea aperea) já foram encontrados parasitados naturalmente e infectados experimentalmente por Bastos (1975) e Dias (1976), entretanto apesar de suportarem elevada carga de parasitos, são de difícil criação e manutenção, em condições de laboratório.

A perfusão de camundongo infectado forneceu maior número de vermes machos. Admitimos que este fato seja decorrência de termos trabalhado com vermes adultos, plenamente desenvolvidos, desprezando os atrofiados. Sabe-se que as fêmeas necessitam da presença do verme macho para seu completo desenvolvimento, não ocorre este fenômeno com os vermes machos que se desenvolvem plenamente na ausência das fêmeas (Standen, 1953 Moore, Yolles & Meleney, 1954 e Erasmus, 1974). Além deste fato os vermes machos apresentaram-se, em média, três vezes mais pesados que os vermes fêmeas.

O manuseio de antígenos de complexidade e características bioquímicas desconhecidos, como homogeneizados de esquistossomos, embaraçam a interpretação dos resultados obtidos (Kent, 1963b). As proteínas contidas nestes extratos são extremamente sensíveis ao congelamento e descongelamento sucessivos,

havendo desnaturação e precipitação irreversíveis de 50% das proteínas solúveis (Kent, 1963b). As nossas observações indicam que apenas um sistema precipitante continuava sendo revelado, após o congelamento e descongelamento sucessivo do antígeno. Aquecendo-se experimentalmente, o mesmo material por uma hora a 56°C observava-se a persistência do mesmo sistema precipitante. Como os polissacárides de S. mansoni tem-se revelado antigênicos (Kent, 1963a; Harris, 1973 e OMS, 1974) podemos supor que este antígeno seja de natureza polissacarídica.

Sodeman (1968) verificou que a manutenção em geladeira a 4°C não é suficiente para preservar antígenos de cercárias. Não é conhecido o mecanismo desta inativação; entretanto, Kronman (1965) sugeriu que esta inativação seja devida a enzimas, contidas nestes extratos. Capron (1970) encontrou em extratos de S. mansoni oxirredutases e hidrolases que atuam sobre as frações antigênicas deste material, inativando-as. Weather & Wilson (1976) encontraram no tegumento do S. mansoni fosfatase alcalina, adenosina trifosfatase e indoxil esterase, além de outras enzimas mitocondriais.

A observação de que o mertiolate, na concentração habitualmente utilizada como preservativo, quando colocado nos extratos salinos diminui sua antigenicidade, pode estar ligada à desnaturação das proteínas, por coagulação destas; e quando colocado nos antisoros, melhorando a reatividade destes pode estar ligada a propriedade deste composto mercurial atuar sobre enzimas (Haurowitz, 1969)

Os antisoros utilizados para as reações de imunodifusão não apresentaram títulos de anticorpos que permitissem diluições adequadas para que trabalhasse com baixas concen

trações dos antígenos. Em que pese o pequeno número de coelhos utilizados para imunizações, os resultados obtidos sugerem fortemente que a obtenção de anticorpos específicos contra os diferentes extratos salinos é estritamente dependente da via de inoculação e da dose administrada. Nos coelhos do grupo 1 as inoculações foram segundo o esquema de Damian (1966), por via intravenosa. Os soros destes coelhos apresentaram uma linha de precipitação até a 5ª injeção intravenosa. Após a 6ª inoculação intravenosa não mais houve formação de linhas de precipitação. Os coelhos do grupo 2 seguiram este esquema até a 5ª inoculação intravenosa, comportando-se similarmente, quanto a produção de anticorpos. Quando o esquema foi alterado, passando, estes coelhos do grupo 2, a serem inoculados por via intradérmica, houve aumento da reatividade dos antisoros, com o aparecimento de novos sistemas precipitantes.

Seguramente são necessários estudos de imunização com maior número de animais, assim como, com soluções antigênicas padronizadas, cujas frações sejam conhecidas para que se possa tirar conclusões sobre estes fatos. É provável que vários fatores estejam influenciando sobre este fenômeno, sendo o mecanismo de imunossupressão um deles, como demonstrado por Mota Santos et al. (1976) e Ramalho Pinto et al. (1976). Outro fator - que pode estar interferindo com o fenômeno é a desnaturação fácil destes antígenos. Embora se saiba que o adjuvante de Freund não desnatura a hemoglobina (Berzofsky, 1976), não existem informações concernentes aos antígenos de S. mansonii.

Utilizando número maior de coelhos em suas experiências (Damian, 1966) obtve resultados variáveis de um coelho para outro. O esquema de imunização utilizado por Biguet et al

(1962, 1965) e Capron et al (1965) também em número elevado de coelhos, obtiveram resultados excelentes, com títulos de anticorpos elevados que permitiram estudos mais completos destes antígenos, quando compararam com os antígenos de outros parasitos: nematódeos, cestódeos e trematódeos, bem como em relação aos antígenos de S. mansoni em suas várias fases do ciclo.

As reações de precipitação em meio gelificado, - com estes antígenos, regra geral, apresentam linhas de precipitação tênues, impedindo a documentação por métodos de coloração ou por fotografia direta. Os vários autores que trabalharam com estes antígenos por imunodifusão (Levine, 1959; Kagan, 1961; Kagan & Norman, 1963; Biguet et al 1962, 1965; Capron et al 1965, 1968 e Damian, 1966, 1967) provavelmente tiveram o mesmo problema, porquanto apresentam os resultados em esquemas.

Para obtenção de maior número de sistemas precipitantes, por nós, foram utilizadas concentrações elevadas de proteínas do antígeno (5mg/ml), tendo sido observado que, de maneira geral, as linhas de precipitação apareceram mais próximas do poço onde se encontrava o antígeno. A concentração total do antígeno era alta, mas talvez as frações antigênicas, para as quais haviam anticorpos, estivessem em concentração baixa. Aumentar a concentração total dos extratos salinos, aumentará a possibilidade de erro, na interpretação dos resultados, pelo aparecimento de precipitados inespecíficos, artefatos (Oudin, 1952, e Ouchterlony, 1967). Este fenômeno foi analisado criticamente por Repka (1973) quando trabalhou com antígenos de Trypanosoma cruzi, cuja complexidade, aproxima-se da do S. mansoni.

O teor de polissacarídes e de proteínas estão concordes com os referidos por Biguet et al (1962) e Damian (1966)

Esse extratos continham cerca de 50% de proteínas e 10% de polissacarídes, não tendo sido observado diferenças entre as linhagens. Os lípidos não foram dosados nestes extratos salinos entretanto, Kent (1963b) encontrou percentagem de 30% de lípidos em extratos salinos de vermes adultos.

Tentativas feitas de análise por imunoeletroforese foram infrutíferas. Os extratos salinos, em concentração acima de 20mg/ml, não permitiram a total migração eletroforética do material, ficando retido no poço, grande parte. Este material retido pode ser constituído de proteínas polimerizadas ou precipitadas pela desnaturação, devido ao calor liberado pela passagem da corrente elétrica. Também grandes polímeros de polissacarídes e outros componentes do extrato, poderiam impedir a passagem do material anigênico pela malha do agar. Estes motivos e aqueles referentes aos antisoros, impediram-nos de efetuar análise mais objetiva.

As reações antígeno-anticorpos, entre o extrato salino e os antisoros, são lentas, necessitando tempo de seis dias para completa precipitação, quando eram feitas as leituras. Aos três dias as linhas de precipitação estão formadas, ocorrendo, entretanto, no decurso deste período, ligeiras modificações de posição e na qualidade das linhas. A complexidade do antígeno, o artifício do preenchimento dos poços e o tempo prolongado de difusão, facilitam o aparecimento de artefatos, decorrentes de precipitação inespecíficas (Ouchterlony, 1967). Damian (1966) fazia as leituras de suas reações no 6º dia, entendendo que as precipitações inespecíficas ocorridas, não seriam obstáculos ao discernimento dos resultados encontrados.

As reações dos doros de coelhos anti-S. mansoni

com antígenos de estroma de hemácias de camundongos, apresentaram uma linha de precipitação. Estes mesmos antisoros reagiram com soro normal e imune de camundongo, revelando, também uma linha precipitação que apresentou identidade com aquela revelada frente ao antígeno de estroma de hemácias de camundongo, sugerindo a presença de antígenos do hospedeiro, absorvidos ou sintetizados pelo parasito.

A presença no esquistossomo de antígenos semelhantes aos dos hospedeiro, é explicada por Dineen (1963a, 1963b), Damian (1964, 1967) e Damian, Greene & Hubrard (1973) como sendo oriundos do próprio soma parasitário. Os referidos antígenos seriam formados às expensas de estruturas preexistentes, semelhantes às encontradas no organismo do hospedeiro. Estas transformações se processariam no decurso do processo de seleção que redundaria numa melhor interação parasito-hospedeiro. Capron et al (1968) admitem que o parasito possui genes latentes que ao serem estimulados, no contato com o hospedeiro, seriam capazes de ativar enzimas para a síntese de proteínas, iguais às do hospedeiro. Smithers (1968) admite que o parasito absorve antígeno do hospedeiro para evadir-se da resposta imune do hospedeiro, adaptando-se ao meio deste.

A demonstração de antígenos do hospedeiro, no parasito foi caracterizado por vários autores (Clegg Smithers, 1970; Dean, 1974; Clegg & Smithers, 1971, 1972; Hockley & Smithers, 1970; Smithers, Terry & Hockley, 1969; Clegg, 1974 e McLaren et al 1975) por experiências in vivo e in vitro. Observaram que estes antígenos do hospedeiro, devem estar firmemente ligados ou mesmo incorporados à superfície do verme, pois persistem após lavagens sucessivas e permanência por três dias no

sistema porta de macacos normais.

Os autores verificaram que macacos imunizados - com hemácias de carneiros não ficam imunes aos vermes crescidos em camundongos e transferidos para seus sistemas porta. Estes antígenos apresentam as mesmas propriedades dos de membrana de hemácias, mas diferem do tipo de antígeno de Forssman (Dean & Sell, 1972 e Sell & Dean, 1972)

A verificação de que soros normais e imunes de coelhos aglutinam hemácias de camundongos, sendo a aglutinação com os soros imunes em títulos mais elevados, constitui mais uma evidência de que o S. mansoni possui antígenos, em comum com o hospedeiro definitivo e que estes antígenos não são do tipo Forssman (Damian, 1967) pois hemácias de camundongos não possuem antígenos de Forssman (Davidsohn & Stern, 1950). As diferenças nos títulos aglutinantes dos soros normais e imunes, por nós obtidos, não são significativas, para corroborar esta opinião.

O S. mansoni apresenta composição antigênica com peculiaridade que dificultam seu estudo. A análise das reações de precipitação em gel de agar, com este material deve ser feita criticamente, antes de se obter informações mais fidedignas. Julgamos ser necessário o emprêgo de técnicas que possibilitem o fracionamento do extrato bruto, visando obtenção de componentes antigênicos separadamente.

Como vimos, a necessidade de utilização de grande quantidade de antígenos para o estudo das frações purificadas, constituiu um grande obstáculo na realização de nosso trabalho. Face às dificuldades com o manuseio do parasito e a obtenção de antisoros fracos, tornaram impossível a comparação entre as linhagens de S. mansoni.

5-) RESUMO E CONCLUSÕES

Com a finalidade de comparar as linhagens mineira (BH) e paulista (SJ) de S. mansoni, estas linhagens foram mantidas em laboratório, utilizando-se como hospedeiros intermediários, respectivamente, a B. glabrata e a B. tenagophila e como hospedeiro definitivo o Mus musculus.

Foram estudados os índices de infecção nos hospedeiros intermediários e definitivos e os antígenos de vermes adultos das duas linhagens.

Os resultados obtidos mostram que:

- 1-) A B. glabrata é mais suscetível à infecção simpátrica do que a B. tenagophila.
- 2-) A percentagem de infecção de camundongos expostos às duas linhagens, não apresentou diferenças significativas. Obteve-se maior número de vermes machos em ambas as linhagens, sendo o peso médio dos vermes machos três vezes maior do que o peso médio dos vermes fêmeas.
- 3-) Não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens, no conteúdo de polissacárides e de proteínas, entretanto, os vermes machos apresentaram 10% mais de polissacárides e os vermes fêmeas 20% mais de proteínas.
- 4-) A imunização de coelhos com antígenos de S. mansoni, utilizando-se dois esquemas de imunização diferentes, mostraram que apenas um destes esquemas permitiu a obtenção de antisoros, mesmo assim, de baixa reatividade.
- 5-) A análise destes antígenos por técnicas de precipitação, em meio gelificado, utilizando os antisoros obtidos não revelou diferenças entre as linhagens. Contudo, estas re-

sultados, devido ao fato de termos trabalhado antisoros pouco potentes e com antígenos que se mostraram muito labeis à manipulação, não eliminam a possibilidade da existência de diferenças antigênicas entre as duas linhagens estudadas.

- 6-) Os imunesoros anti-S. mansoni macho de ambas as linhagens testados frente a estroma de hemácias de camundongos normais e frente a soros normais e imunes de camundongos revelaram um sistema precipitante que reagiram cruzadamente.
- 7-) Os imunesoros de coelhos testados frente a hemácias de camundongos não mostraram aumento significativo do título aglutinante quando comparados com os soros antes da imunização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSTEE, J. D. & TANNER, M. J. A. - Blood-group serology of fractions obtained from the human erythrocyte membrane. Eur J. Biochem., 45:31-37, 1974.
- BARBOSA, F. S. - O parasito. Revta bras. Malar. Doenc. trop. 11(2/3):119-150, 1959.
- BARBOSA, F. S. & BARRETO, A. C. - Differences in susceptibility of brazilian strains of Australorbis glabratus to Schistosoma mansoni. Expl Parasit., 9(2):137-140, 1960.
- BASTOS, O. C. de - Estudo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens humana e silvestre do Schistosoma mansoni Sambon, 1907. Campinas. Tese- Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- BERZOFKY, J. A.; SCHECHTER, A. N. & KON, H. - Does Freund's adjuvant denature protein? ERP of studies of emulsified hemoglobin. J. Immun., 115(2):270-272, 1976.

- BIGUET, J.; ROSÉ, F.; CAPRON, A. & VAN KY, P. T. - Contribution de l'analyse immunoelectrophoretique a la connaissance des antigenes vermineux. Incidences pratique, sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoelectrophoretique. Revue Immunol., 29 (1/2):5-30, 1965.
- BRENER, Z. - Esquistossomose experimental. Revta bras. Malar. Doenc. trop., 11(2/3):473-506, 1959.
- BRENER, Z. - Observações sobre a infecção do camundongo pelo Schistosoma mansoni. Revta bras. Malar. Doenc trop., 8(4):565-575, 1956.
- CAPRON, A.; BIGUET, J.; ROSÉ, F. & VERNES, A. - Les antigenes de Schistosoma mansoni. II.- Étude immunoelectrophoretique comparée de divers stades larvaires et des adultes de deux sexes. Aspects immunologiques de relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de Schistosoma mansoni. Annls Inst. Pasteur, Paris., 109:798-810, 1965.
- CAPRON, A.; BIGUET, J.; VERNES, A. & AFCHAIN, D. - Les structure antigenique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path. Biol. Paris., 16(3):121-138, 1968.
- CAPRON, A. - Immunity-host response. Second Congress International of Parasitology. Charmain: E.J.L. Solousby (USA). A.M september 10. p. 515-521, 1970.
- CLEGG, J. A. - Host antigens and the immune response in schistosomiasis. In: Parasites in the immunized host: Mechanisms of survival. Ciba Foundation Symposium, 1974.

- CLEGG, J. A.; SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. - Host antigens associated with schistosome: observation on their attachment and their nature. Parasitology., 61:87-94, 1970.
- CLEGG, J. & SMITHERS, S. R. - Acquisition of human antigens by Schistosoma mansoni during cultivation in vitro. Nature Lond 232:653-654, 1971.
- CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. - The effects of immune rhesus monkey serum of schistosomula of Schistosoma mansoni during cultivation in vitro. Int. J. Parasit., 2:79-98, 1972.
- CUNHA, A. S. - Esquistossomose mansoni. São Paulo. Editora da Universidade de S. Paulo, 1970.
- DAMIAN, R. T. - Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host it's consequences. Am. Nat., 98:129-149, 1964.
- DAMIAN, R. T. - An immunodiffusion analysis of some antigens of Schistosoma mansoni adults. Expl Parasit., 18:255-265, 1966
- DAMIAN, R. T. - Common antigens between adult Schistosoma mansoni and laboratory mouse. J. Parasit., 53(1):60-64, 1967.
- DAMIAN, R. T.; GREENE, N. D. & HUBBARD, W. L. - Occurrence of mouse alfa 2-macroglobulin antigenic determinants on Schistosoma mansoni adult, with evidence on their nature. J. Parasit., 59(1):64-73, 1973
- DEAN, D. A. - Schistosoma mansoni: adsorption of human blood group A and B by schistosomula. J. Parasit., 60(2):260-263, 1974.

- DEAN, D. A. & SELL, K. W. - Surface antigens on Schistosoma mansoni. II.- Adsorption of a Forssman-like host antigen by schistosomula. Clin. Expt. Immun., 12:525-530, 1972.
- DIAS, L. C. S. - Aspectos parasitológicos e ecológicos da esquistossomose mansônica no Vale do Rio Paraíba do Sul e da represa de Americana estado de São Paulo Brasil. Campinas Tese - Instituto de Biologia da UNICAMP, 1976.
- DINEEN, J. K. - Antigenic relationship between host and parasite. Nature., 197:471, 1963a.
- DINEEN, J. K. - Immunological aspects of parasitism. Nature., 197:268-269, 1963b.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Annls Chem., 28(3):350-356, 1956.
- ERASMUS, D. A. - A comparative study of the reproductive system of mature, immature and unisexual female Schistosoma mansoni. Parasitology., 67:165-183, 1973.
- FILES, V. S. - A study of the vector-parasite relationship in Schistosoma mansoni. Parasitology., 41:264-269, 1951.
- FILES, V. S. & CRAM, E. B. - A study on the comparative susceptibility of snails vectors to strains of Schistosoma mansoni. J. Parasit., 35:555-560, 1949.
- FREUND, J. - The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization. Am. J. Clin. Path., 21:645-656, 1951.

- GRABAR, P. & BURINI, P. - Immuno-electrophoretic analysis. Amsterdam, London, New York: Elsevier Publishing Company. 1964.
- HARRIS, W. G. - The allergen of Schistosoma mansoni. I.- Initial separation and comparative assay. Immunology., 24(3): 567-577, 1973.
- HAUROWITZ, F. - Enzimas: proteínas com propriedades enzimáticas. In: Química y Function de las Proteínas. Barcelona. Ediciones omega- Casa Nova, p.312-344, 1969.
- HOCKLEY, D. L. & SMITHERS, S. R. - Damage to adult Schistosoma mansoni after transfer to hyperimmune host. Parasitology 61:95-100, 1970
- KABAT, E. A. & MAYER, M. M. - Immunoquímica Experimental. La Prensa Medica Mexicana- Mexico, 1968.
- KAGAN, I. G. - Gel-diffusion techniques for the analysis of parasitic materials. Proc Helminth. Soc. Wash., 28:97-102, 1961.
- KAGAN, I. G. - Characterization de antígenos parasitarios. Bull Ofic. San. Panam., 67(1):13-32, 1969
- KAGAN, I. G. & PELLEGRINO, J. - A critical review of immunological methods for the diagnosis of bilharziasis. Bull. Wld. Hlth. Org., 25:661-674, 1961.
- KAGAN, I. G. & NORMAN, L. - Analysis of helminth antigens Echinococcus granulosus and Schistosoma mansoni by agar gel methods. Ann. N. Y. Acad. Sci., 131:130-153, 1963.

- KAGAN, I. G. & GEIGER, S. J. - The susceptibility of three strains of Australorbis glabratus to Schistosoma mansoni from Brazil on Puerto Rico. J. Parasit., 51(4):622-27, 1965
- KENT, N. H. - Antigens. Expl Parasit., 13:45-56, 1963a.
- KENT, N. H. - Comparative immunochemistry of larval and adults of Schistosoma mansoni. Ann. N.Y. Acad. Sci., 113:105-113, 1963b.
- KRONMAN, B. S. - Immunochemistry of Schistosoma mansoni cercariae. J. Immun., 95(1):13-18, 1965.
- LEMON NETO, R. C. - Estudo comparativo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens mineira e paulista do Schistosoma mansoni Sambon, 1907. Campinas. Tese- Instituto de Biologia da UNICAMP, 1975.
- LENARD, J. - Protein and flicolipid components of human erythrocytes membranes. Biochemistry., 95(39)1129-1132, 1970.
- LEVINE, D. L. - Studies on the immunology and serology on schistosomiasis. Diss. Abstr., 19:2694-2703, 1959.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol Chem., 193:265-275, 1951.
- LUTZ, A. - Observações sôbre a evolução do Schistosoma mansoni. 1ª nota prévia. Bras.-med., 30: 385, 1916.
- LUTZ, A. - Observações sôbre a evolução do Schistosoma mansoni. 2ª nota prévia. Bras.-med., 31:81-90, 1917.

- LUTZ, A. - Estudos sobre a schistosomatose feitas no Nordeste do Brasil, por uma comissão do Instituto Oswaldo Cruz. Mems Inst. Oswaldo Cruz., 10:83-94, 1918.
- MADDY, A. H. - The solubilization of the protein of the ox-erythrocyte. Biochim. Biophys. Acta., 88:448-449, 1964.
- McLAREN, D. J.; CLEGG, J. A. & SNITHERS, S. R. - Acquisition of host antigen by young Schistosoma mansoni in mice: correlation with failure to bind antibody in vitro. Parasitology., 70(1):67-75, 1975.
- MAGALHÃES, L. A. - Moluscos planorbídeos do Distrito Federal Brasília. Campinas. Tese- Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas, 1966.
- MAGALHÃES, L. A. - Técnica para avaliação da viabilidade de penetração de cercárias de Schistosoma mansoni em Mus musculus. Hospital, Rio de J., 75:137-140, 1969a.
- MAGALHÃES, L. A. - Estudos dos dados obtidos de uma população de Biomphalaria glabrata de Belo Horizonte infectada com Schistosoma mansoni da mesma cidade e de uma população de Biomphalaria tenagophila de Campinas, infectada por Schistosoma mansoni de S. José dos Campos. Revta Soc. bras. Med. trop., 3:195-196, 1969b.
- MAGALHÃES, L. A. - Linhagens do Schistosoma mansoni. Patogenia da esquistossomose. J. bras. Med., 7:32-33, 1976.

- MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. de - Determinação do número de cercárias provenientes de cepas diferentes do Schistosoma mansoni que conseguem penetrar sob determinadas condições de laboratório em Mus musculus. Revta Soc. bras. Med. trop., 3(5):249-251, 1969.
- MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. de - Desenvolvimento do Schistosoma mansoni das linhagens de B. Horizonte (MG) e de S. José dos Campos (SP), S. Paulo. Revta Saúde Públ., 7: 285-287, 1973.
- MAGALHÃES, L. A.; ALCÂNTARA, J. G. & CARVALHO, J. F. de - Alguns dados referentes ao estudo parasitológico e anatomopatológico de duas linhagens de Schistosoma mansoni, Sambon, 1907. Revta Saúde Públ., 9:1-5, 1975.
- MOORE, D. V.; YOLLES, T. K. & MELENEY, H. E. - The relationship of male worms to the sexual development of female Schistosoma mansoni. J. Parasit., 40:166-185, 1954.
- MOORE, D. V.; YOLLES, T. K. & MELENEY, H. E. - A comparison of common laboratory and experimental host for Schistosoma mansoni. J. Parasit., 35:156-170, 1949.
- MOTA SANTOS, T. A.; GAZINELLI, G.; RAMALHO PINTO, J. F. & PELLEGRINO, J. - Immunodepression in mice following Schistosoma mansoni infection. Revta Inst. Med. trop. S. Paulo. 18(4):246-250, 1976.
- NEWTON, W. L. - The comparative tissue reaction of two strains of Australorbis glabratus to infection with Schistosoma mansoni. J. Parasit., 38:262-266, 1952.

- NEWTON, W. L. - The inheritance of susceptibility to infection with Schistosoma mansoni in Australorbis glabratus. Expl Parasit., 2:242-257, 1953.
- OLIVIER, L. & SIREWALT, M. A. - An efficient method for exposure of mice to cercariae of Schistosoma mansoni. J. Parasit., 38:19-23, 1952.
- LOUDIN, J. - Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. In: Methods Medical Research Yearbook., 5:335-378, 1952.
- OUCHTERLONY, O. - Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Handbook of Experimental Immunology. Ed. by D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh. p. 655-705, 1967.
- PARAENSE, W. L. & CORREA, L. R. - Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do Schistosoma mansoni no Brasil. Cienc. Cult., 15(3):245-246, 1963a.
- PARAENSE, W. L. & CORREA, L. R. - Variation in susceptibility of populations of Australorbis glabratus to strains of Schistosoma mansoni. Revta Inst. Med. trop. São Paulo., 5(1):15-22, 1963b.
- PARAENSE, W. L. & CORREA, L. R. - Susceptibility of Australorbis tenagophilus to infection with Schistosoma mansoni. Revta Inst. Med. trop. São Paulo., 5(1):23-29, 1963c.
- PELLEGRINO, J. & MACEDO, O. G. - A simplified method for the concentration of cercariae. J. Parasit., 41:329-330, 1955.

- PELLON, A. B. & TEIXEIRA, I. - Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil. Publicação da "Divisão de Organização Sanitária" do Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 1950.
- PELLON, A. B. & TEIXEIRA, I. - Inquérito helmintológico escolar em cinco estados das regiões Leste, Sul e Centro-Oeste. Publicação da "Divisão de Organização Sanitária" do Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 1952.
- PESSOA, S. B. & MARTINS, A. V. - Esquistossomose mansônica. In: Parasitologia Médica. 9ª Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1974.
- PIRAJÁ da SILVA. - Contribuição para o estudo da schistosomose na Bahia. Bras.med., 22:281-283, 1908a.
- PIRAJÁ da SILVA. - Contribuição para o estudo da schistosomose na Bahia. Bras.-med., 22:441-444, 1908b.
- PIRAJÁ da SILVA. - Contribuição para o estudo da schistosomose na Bahia. Bras.-med., 22:451-453, 1908c.
- PIRAJÁ da SILVA. - Cercaire brésilienne (*cercaria blanchardi*) a queue bifurquée. Arch Parasit., 15:398-400, 1912.
- RAMALHO PINTO, F. J.; SOUZA, J. B. & PLAYFAIR, J. H. L. - Stimulation and supression of mouse T cells to the schistosomes of Schistosoma mansoni during infection. Nature, Lond., 259(19):603-604, 1976.
- REPKA, D. - Contribuição ao estudo imunoquímico das formas de cultivo do Trypanosoma cruzi. Campinas. Instituto de Biologia, UNICAMP, 1973.

- REY, L. - Contribuição para o conhecimento da morfologia, biologia e ecologia dos planorbídeos brasileiros transmissores da esquistosomose. Rio de Janeiro, SNES, 1956.
- RICHARDS, C. S. - Susceptibility of adult Biomphalaria glabrata to Schistosoma mansoni. Am. J. trop. Med. Hyg., 22(6): 748-756, 1973.
- RICHARDS, C. S. & MERRIT Jr, J. W. - Genetic factors in the susceptibility of juvenile Biomphalaria glabrata to Schistosoma mansoni infection. Am. J. trop. Med. Hyg., 21(4): 425-434, 1972.
- SADUN, E. H.; SCHOENBECHLER, M. J. & BENTZ, M. - Multiple antibody response in Schistosoma mansoni infection antigenic constituents in eggs, cercariae and adults (excretion and secretion) determined by flocculation reactions, cross absorption and double diffusion studies. Am. J. trop. Med. Hyg., 14:977-995, 1965.
- SELL, K. W. & DEAN, D. A. - Surface antigens on Schistosoma mansoni. I.- Demonstration of antigens on schistosomula and adult worms using the mixed antiglobulin test. Clin. Expl Immun., 12:315-324, 1972.
- SMITHERS, S. R. - Geldiffusion studies on Schistosoma mansoni Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 54(1):8, 1960.
- SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. - The infection of laboratory host with cercariae of Schistosoma mansoni and recovery of the adult worms. Parasitology., 55:695-700, 1965.

- SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. - Do adult schistosome masquerade as their host? Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 62: 466-467, 1968.
- SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. & HOCKLEY, D. J. - Host antigens in schistosomiasis. Proc. R. Soc. Biol. 171:483, 1969
- SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. - The immunology of schistosomiasis. Adv. Parasit., 14:399-422, 1976.
- SODEMAN Jr, W. A. - Studies on the protein composition of extracts of Schistosoma mansoni cercariae. J. Parasit., 54 (4):775-779, 1968.
- STANDEN, O. D. - Experimental schistosomiasis. II. - Maintenance of Schistosoma mansoni in the laboratory with some notes on experimental infection with Schistosoma hematobium. Ann. trop. Med. Parasit., 45:268-283, 1949.
- STANDEN, O. D. - The effects of temperature, light and salinity upon hatchling of the ova Schistosoma mansoni. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 45(2):225-241, 1951.
- STANDEN, O. D. - Experimental infection of Australorbis glabratus with Schistosoma mansoni. I.- Individual and mass infection of snails and the relationship of infection to temperature and season. Ann. trop. Med. Parasit., 46(1): 48-52, 1952.
- STANDEN, O. D. - The relationship of sex in Schistosoma mansoni to migration within the hepatic port system of experimentally infected mice. Ann. trop. Med. Parasit., 47: 139-145, 1953.

- STIREWALT, M. A. - Penetration of definitive host skin by cercariae of Schistosoma mansoni. J. Parasit., 39:18-25, 1953
- STIREWALT, M. A.; KUNTZ, R. E. & EVANS, A. S. - The relative susceptibilities of the commonly used laboratory mammals to infection by Schistosoma mansoni. Am. J. trop. Med. Parasit., 31(7):57-82, 1951.
- UPATHAM, E. S. & STURROCK, R. F. - Studies on the effects of cercariae concentration and length of exposure on the infection of mice by Schistosoma mansoni. Parasitology, 67(2):219-228, 1973.
- URIEL, J. - Color reactions for the identification of antigen-antibody precipitates in gel diffusion media. Mimeographed.
- WARREN, K. S. - A comparison of puerto rican, brazilian, egyptian and tanzanian strains of Schistosoma mansoni in mice: Penetration of cercariae, maturation of schistosomes and production of liver disease. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg 61(6):795-802, 1967.
- WARREN, K. S. & PETERS, P. A. - Quantitative aspects of exposure time and cercarial diffusion on penetration and maturation of Schistosoma mansoni in mice. Ann. trop. Med. Parasit., 61(3):294-301, 1967.
- WHEATER, P. R. & WILSON, R. A. - The tegument of Schistosoma mansoni a histochemical investigation. Parasitology., 72:99-109, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. - Immunology of schistosomiasis.

Bull. Wld. Hlth. Org., 51(6): 533-593, 1974.

YOLLES, T. K.; MOORE, D. V.; DE GINSPI, D. L.; RIFSON, C. A. & MELENEY, H. E. - A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. J. Parasit. 33:419-426, 1947.

Foram seguidas as regras da:

ABNT- Normalização da documentação no Brasil. 2ª Edição, Rio de Janeiro. Instituto Brasileiro de Bibliografia e Documentação, 1964.

WORLD MEDICAL PERIODICAL- 3rd edition, New York, World Medical Association, 1961.